

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТАРНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНЫМ СИНУСИТОМ, СТРАДАЮЩИХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Е.В. Огнивенко¹, Н.Н. Попов¹, Е.А. Романова²

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, Украина

²Институт микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова АМН Украины, Харьков, Украина

РЕЗЮМЕ

В работе изучена фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов у больных верхнечелюстным синуситом, страдающих сахарным диабетом. У больных хроническим верхнечелюстным синуситом, страдающих сахарным диабетом, наблюдается угнетение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов, нарушение процессов захвата и киллинга бактерий, депрессия оксидантной микробицидной системы и активности рецепторного аппарата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: иммунитет, фагоциты, хронический верхнечелюстной синусит, сахарный диабет

Клинические наблюдения свидетельствуют о том, что в последнее время наблюдается устойчивая тенденция к росту числа хронических бактериальных и вирусных заболеваний ЛОР-органов, среди которых весьма значительной является доля синуситов. Для лиц с сахарным диабетом характерным является непрерывное рецидивирующее течение заболевания и малая эффективность антимикробной и симптоматической терапии [2].

В возникновении и развитии хронических риносинуситов наряду с особенностями возбудителя, его патогенными, вирулентными и инвазивными свойствами большую роль играют иммунные нарушения как системного, так и местного характера, расстройства во взаимодействии различных звеньев иммунной системы [1, 8].

Ведущая роль в элиминации инфекционных агентов из организма принадлежит клеткам с фагоцитарными свойствами, иммуноглобулинам и комплементу. Фагоциты обеспечивают поглощение и переваривание микробов, а комплемент и иммуноглобулины усиливают этот процесс [4].

Эффективная комплексная терапия хронических инфекционно-воспалительных заболеваний предусматривает применение иммунокорректирующих средств, а адресность их назначения предполагает выяснение характера расстройств в иммунной системе и степени нарушения в отдельных ее звеньях.

Учитывая вышеизложенное, целью настоящей работы явилось изучение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов у больных верхнечелюстным синуситом, страдающих сахарным диабетом.

Подобные данные в зарубежной и отечественной литературе отсутствуют.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено иммунологическое обследование 30 больных хроническим гнойным верхнечелюстным синуситом в фазе обострения на фоне инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД). Степень тяжести СД определялась как среднетяжелая. Контрольную группу составили 30 здоровых лиц.

По данным микробиологического исследования этиологическими факторами заболевания выступали бактериальные ассоциации, представленные грамположительными бактериями *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*; грамотрицательными бактериями – *E. coli*, *P. aeruginosa*; анаэробами – *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* spp.

Программа иммунологического исследования включала изучение фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов, эффективности внутриклеточного киллинга бактерий, состояния кислородзависимых микробицидных систем клеток, плотности экспрессии молекул CD11b, CD16, CD35, CD14.

Лейкоциты из периферической крови выделяли на 3%-ном растворе желатина. Взвесь мононуклеарных лейкоцитов получали на градиенте плотности фикола-верографина 1,077, нейтрофилы – на градиенте двойной плотности 1,093:1,077 [6]. Фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов оценивали по их способности поглощать бактерии *S.aureus* (штамм 209) [3]. Для этого смешивали 1 мл суспензии клеток (10^7) и 1 мл взвеси бактерий (10^9) в растворе Хенкса. Смесь инкубировали 30 мин при температуре 37°C при постоянном помешивании. По окончании процедуры на стеклах готовили мазки, которые окрашивали по Романовско-Гимзе. В препаратах подсчитывали 200 клеток, из них число фагоцитировавших кле-

ток (ФЧ) и число бактерий, поглощенных одной клеткой (ФИ). Эффективность фагоцитоза опсонизированных бактерий изучали таким же способом. Опсонизацию бактерий проводили в растворе Хенкса, содержащем 20% термоактивированной сыворотки больных (ауто сыворотки) или сыворотки здоровых доноров (пул от 3-5 доноров) в течение 30 мин при 37°C. Бактерицидную способность (БС) фагоцитов оценивали по методу S.Nielsen [9]. После 30-минутной инкубации лейкоцитов со стафилококком неоплощенные бактерии отмывали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин. Число поглощенных, но живых стафилококков определяли после высева лизата клеток по методу Гольда на чашки Петри с мясопептонным агаром. Лизис лейкоцитов проводили путем добавления 3-кратного объема воды. Активность кислородзависимой микробицидной системы фагоцитов оценивали в спонтанном и стимулированном *S.aureus* НСТ-тесте [3]. Результаты учитывали морфологически, определяя относительное количество формазанположительных клеток.

Количество CD11b⁺-, CD16⁺-, CD35⁺-клеток в суспензии нейтрофилов и CD14⁺-клеток в суспензии мононуклеаров определяли методом непрямой мембранной иммуофлюоресценции с использованием панели моноклональных антител («Сорбент», Москва) [5]. О плотности экспрессии на клетках молекул CD11b, CD16, CD35, CD14 судили по интенсивности флюоресценции клеток, об-

работанных моноклональными антителами, меченными ФИТЦ. Интенсивность свечения клеток выражали в относительных единицах. Весь диапазон флюоресценции клеток делили на 3 равные части: 0,05-0,20 отн. ед. – считали слабой, 0,21-0,40 отн. ед. – средней, 0,41-0,60 отн. ед. – сильной. В каждом образце изучали по 200 клеток. Полноценность реакции рецепторного аппарата клеток больных хроническим гнойным синуситом оценивали в сравнении с таковой клеток больных острым гнойным синуситом, протекающим без осложнений (32 человека).

Математическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Данные в тексте приведены в виде среднего арифметического значения M и среднеквадратичного отклонения σ .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование крови больных верхнечелюстным синуситом, страдающих сахарным диабетом, показало, что заболевание протекает на фоне повышения общего количества лейкоцитов, увеличения относительного и абсолютного числа палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов, абсолютного числа моноцитов (табл. 1).

Таблица 1

Показатели периферической крови больных хроническим верхнечелюстным синуситом, страдающих сахарным диабетом ($M \pm \sigma$)

Показатели	Здоровые лица	Больные
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$6,3 \pm 0,57$	$9,2 \pm 0,65^*$
Лимфоциты, %	$30,9 \pm 1,16$	$22,5 \pm 1,27^*$
абс. число/л ($\times 10^9$)	$1,9 \pm 0,15$	$1,9 \pm 0,18$
Нейтрофилы палочкоядерные, %	$2,5 \pm 0,10$	$6,0 \pm 0,31^*$
абс. число/л ($\times 10^9$)	$0,15 \pm 0,010$	$0,55 \pm 0,032^*$
Нейтрофилы сегментоядерные, %	$57,5 \pm 1,19$	$64,0 \pm 1,21^*$
абс. число/л ($\times 10^9$)	$3,60 \pm 0,16$	$5,89 \pm 0,16^*$
Моноциты, %	$7,1 \pm 0,18$	$6,3 \pm 0,69$
абс. число/л ($\times 10^9$)	$0,45 \pm 0,017$	$0,58 \pm 0,0064^*$

* $p < 0,05$ по сравнению с показателями здоровых лиц

Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных верхнечелюстным синуситом число клеток, потенциально способных к фагоцитозу, составляет 76,3%, у здоровых лиц – 67,1% от общего числа лейкоцитов. Соответственно абсолютное число клеток с фагоцитарной активностью в крови больных в 1,67 раз выше, чем у лиц контрольной группы.

Изучение фагоцитарной активности клеток показало, что поглощение бактериальных частиц и переваривающая способность

нейтрофилов и моноцитов больных значительно ниже, чем у контрольной группы лиц (табл. 2). Низкая фагоцитарная способность клеток больных наблюдалась и в отношении опсонизированных ауто сывороткой бактерий. Донорская сыворотка в качестве опсонина в несколько большей степени повышала фагоцитарную активность клеток больных. При этом достоверно повышался только фагоцитарный индекс, отражающий число бактерий, захватываемых нейтрофилами и моноцитами (табл. 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что у пациентов с хроническим верхнечелюстным синуситом, страдающих инсулинзависимым сахарным диабетом, снижены

как опсонизирующие свойства самой сыворотки, так и фагоцитарная способность клеток.

Таблица 2

Фагоцитарная и бактерицидная активность нейтрофилов и моноцитов больных хроническим верхнечелюстным синуситом и здоровых лиц (M±σ)

Показатели		Нейтрофилы	Моноциты
Фагоцитарное число (ФЧ), %	больные	56,1±6,2*	54,8±6,5*
	здоровые	75,6±7,2	76,0±7,0
Фагоцитарный индекс (ФИ)	больные	3,2±0,4*	3,0±0,4*
	здоровые	5,7±0,6	5,4±0,6
Число бактерий, выживших после фагоцитоза (БЦ), %	больные	17,3±1,8*	18,1±1,9*
	здоровые	5,0±0,5	4,8±0,5

* p<0,05 по сравнению с показателями здоровых лиц

Таблица 3

Фагоцитарная активность нейтрофилов и моноцитов больных и здоровых доноров в отношении опсонизированных бактерий (M±σ)

Показатели		Сыворотка здоровых доноров	Повышение фагоцитоза, %	Сыворотка больных	Повышение фагоцитоза, %
Нейтрофилы					
Фагоцитарное число (ФЧ), %	больные	64,7±7,2*	115,3	58,8±6,7	104,8
	здоровые	91,5±8,3*	121	81,9±6,78	108,3
Фагоцитарный индекс (ФИ)	больные	5,3±0,6*	165,6	3,2±0,3	0
	здоровые	9,6±0,6*	168,4	6,2±0,6	108,7
Моноциты					
Фагоцитарное число (ФЧ), %	больные	61,9±7,1	112,9	58,1±6,5	106,0
	здоровые	90,3±8,1	118,8	82,5±7,7	108,5
Фагоцитарный индекс (ФИ)	больные	5,0±0,5*	166,6	3,1±0,3	103,3
	здоровые	8,7±0,6*	161,1	6,0±0,5	111,1

* p<0,05 по сравнению с показателями фагоцитоза неопсонизированных бактерий в соответствующей группе обследованных

Исследование клеток в НСТ-тесте показало, что активность кислородзависимой микробицидной системы фагоцитов больных хроническими синуситами достоверно ниже, чем лиц контрольной группы. У больных показатель индуцированного НСТ-теста составлял 22,7±2,16%, у здоровых лиц – 28,1±2,05% (p<0,05).

Учитывая, что фагоцитарная способность нейтрофилов и моноцитов находится в прямой зависимости от состояния их рецепторного аппарата, нами была исследована экспрессия основных молекул, ответственных за этот процесс. Молекула CD14 является специфическим маркером макрофагов, участвует в активации клеток, связывании бак-

терий и их фагоцитозе. CD11b/CD18 принимает участие в хемотаксисе и фагоцитозе, индукции респираторного взрыва, адгезии гранулоцитов и макрофагов к сосудистой стенке. CD16 является субъединицей низкоаффинного Fc-рецептора фагоцитов, участвует в фагоцитозе Ig-опсонизированных микробов. CD35 – рецептор для C4b и C3b, участвует в адгезии клеток и фагоцитозе опсонизированных частиц.

Было показано, что у больных хроническим синуситом наблюдается повышение числа клеток, экспрессирующих эти молекулы, по сравнению с группой здоровых лиц (табл. 4).

Таблица 4

Содержание CD11b⁺, CD16⁺, CD35⁺ нейтрофильных гранулоцитов и CD14⁺-клеток среди лейкоцитов периферической крови больных верхнечелюстным синуситом (M±σ)

Показатели	Здоровые лица	Больные острой формой	Больные хронической формой
Нейтрофилы, %	60,0±1,20	73,4±1,8*	70,0±1,22*
CD11b ⁺ -клетки, %	26,8±3,18	47,1±5,3*	38,7±4,8*
CD16 ⁺ -клетки, %	32,5±3,83	54,8±6,0*	45,9±5,3*
CD35 ⁺ -клетки, %	28,9±3,15	43,7±5,9*	38,7±5,1*
CD14 ⁺ -клетки, %	6,1±0,7	5,9±0,2	5,8±0,2
Моноциты, %	7,1±0,18	7,0±0,18	6,3±0,69

* p<0,05 по сравнению с показателями здоровых лиц

Сравнение полученных данных с показателями больных острым верхнечелюстным

синуситом демонстрирует, что количество клеток, экспрессирующих CD14, CD16,

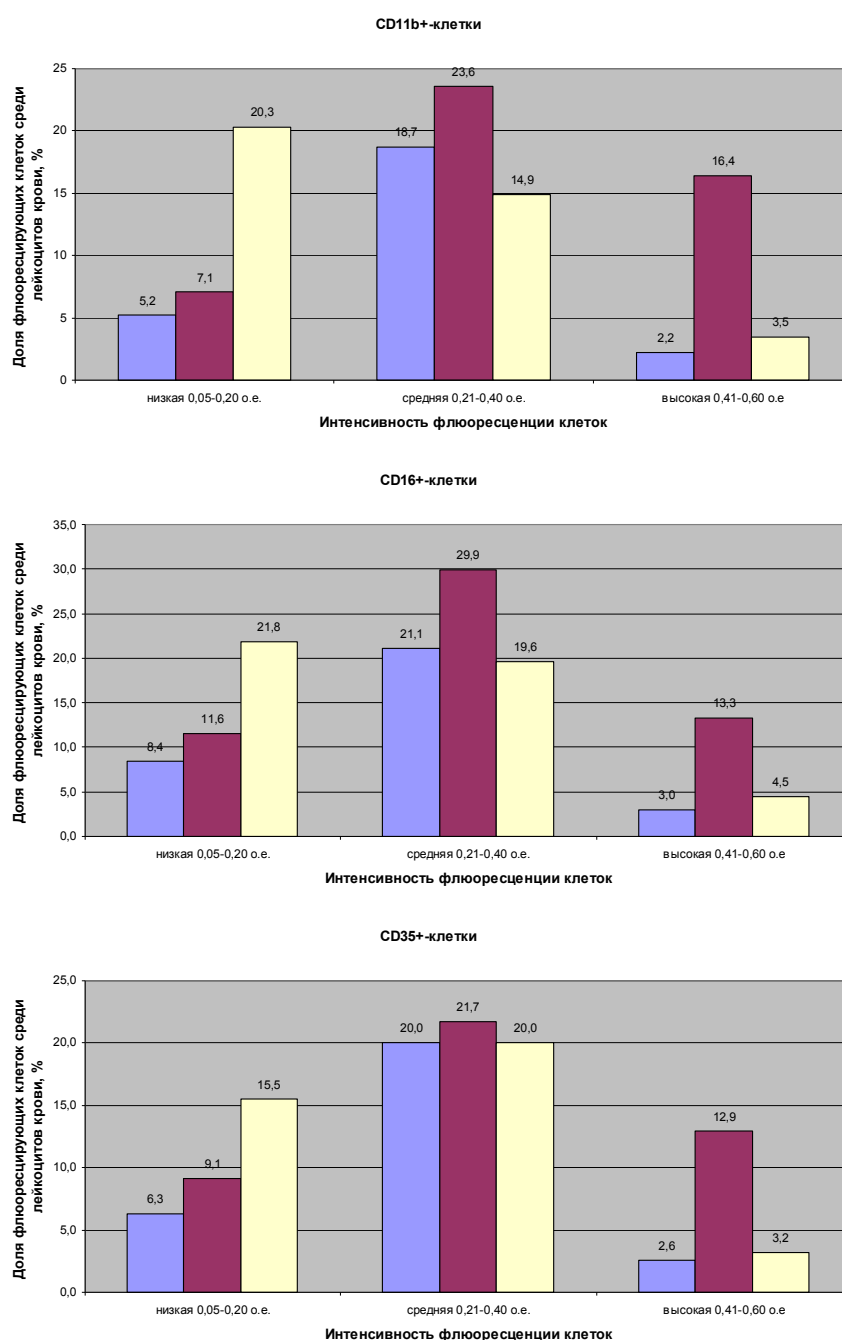
CD11b, CD35, и плотность их экспрессии на клетках значительно ниже у больных хроническим верхнечелюстным синуситом (рис. 1, 2).

Результаты теста иммунофлюоресценции свидетельствуют о том, что у больных хронической формой заболевания практически отсутствуют клетки с высокой степенью флюоресценции, а увеличение доли флюоресцирующих клеток главным образом происходит за счет слабофлюоресцирующих клеток. У больных острой формой заболевания это происходит за счет существенного повышения доли средне- и сильнофлюоресцирующих.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных хроническим верхнече-

люстным синуситом, страдающих сахарным диабетом, наблюдается угнетение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов, нарушение процессов захвата и киллинга бактерий, депрессия оксидантной микробицидной системы и активности рецепторного аппарата.

Выявленные нарушения в фагоцитарных клетках, по-видимому, являются следствием изменений их метаболизма и структурно-функциональных перестроек их мембран. У больных сахарным диабетом, как известно, страдают все виды обменных процессов и адаптационно-регуляторные механизмы.



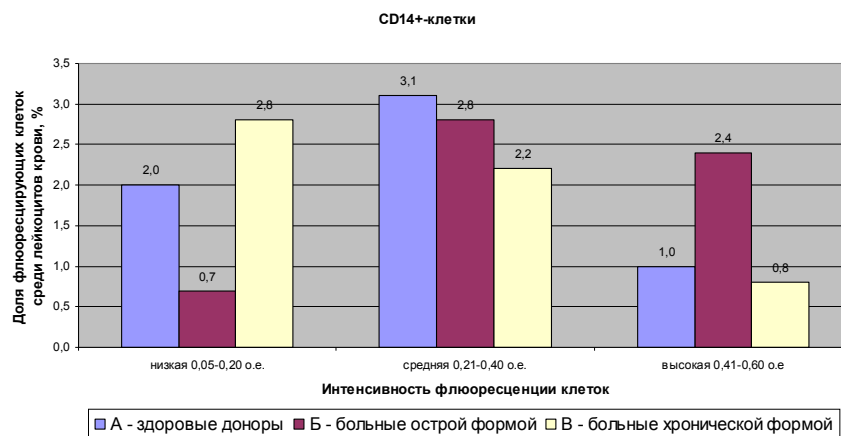
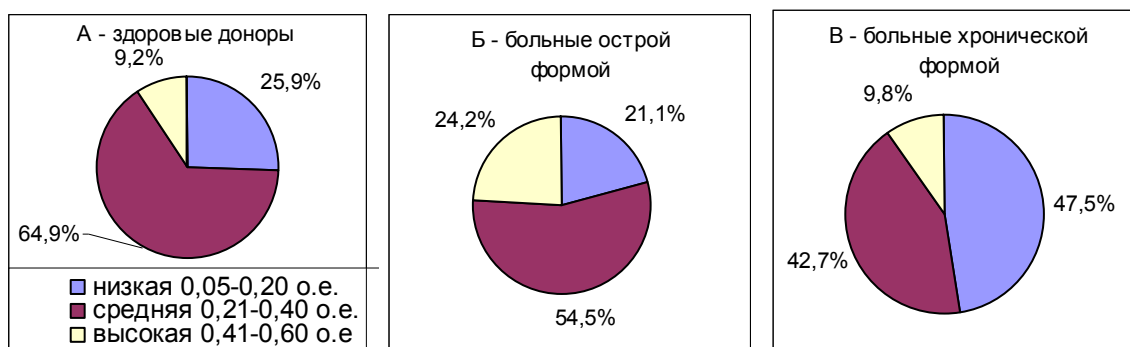


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции клеток, обработанных моноклональными антителами анти- CD11b, CD16, CD35, CD14, меченными ФИТЦ

CD11b⁺-клетки



CD16⁺-клетки



CD35⁺-клетки



CD14⁺-клетки

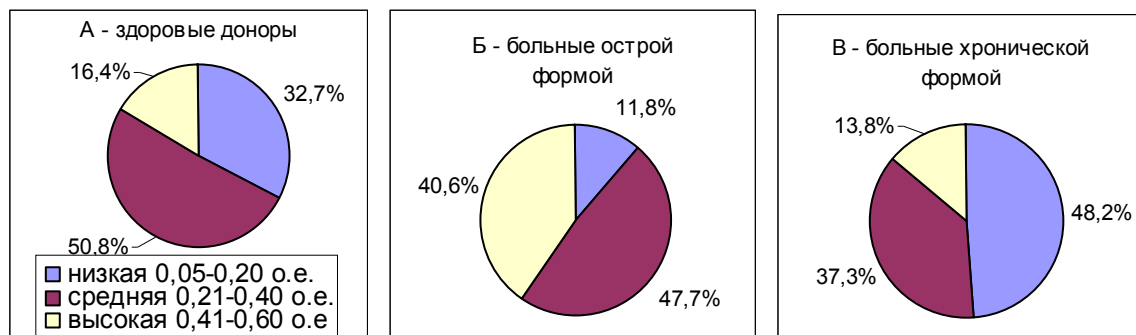


Рис. 2. Распределение клеток по интенсивности флюоресценции среди CD11b⁺, CD16⁺, CD35⁺ и CD14⁺-клеток

ВЫВОДЫ

1. ХГВС на фоне СД сопровождается повышением общего количества лейкоцитов, увеличения относительного и абсолютного числа палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов, абсолютного числа моноцитов.
2. Отмечается низкая фагоцитарная активность клеток больных ХГВС, страдающих СД.
3. У больных ХВС на фоне СД наблюдается

4. У больных ХГВС, страдающих СД увеличено количество слабофлюоресцирующих клеток и практически отсутствуют клетки с высокой степенью флюоресценции.

Представляется важным выяснение характера этих изменений, что позволит предложить адекватную терапию больных ХГВС, страдающих СД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заболотный Д.И., Мельников О.Ф., Тимченко М.Д., и др. // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. - 2003. - № 5. - С. 165.
2. Балаболкин М.И. // Проблемы эндокринологии. - 1997. - Т.43. - № 6. - С. 3-9.
3. Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., и др. «Иммунология: Практикум». -К.:Вища школа. - 1989. - 280 с.
4. Попов М.М., Циганенко А.Я., Мінухін В.В. Основи імунології: Підручник. -Харків:Основа. - 2005. - 276 с.
5. Штерх В., Эммрих И. Определение клеточных маркеров методом мембранной иммунофлюоресценции. Иммунологические методы. / Под ред. Г. Фримеля. -М.:Медицина. - 1987. 254 с.
6. Эккерт Р. Разделение клеток иммунной системы. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. -М.:Медицина. - 1987. - 244 с.
7. Заболотный Д.И., Луценко В.І., Розкладка А.І. - Ринологія. - 2003. - № 2. - С. 26-29.
8. Nielsen S.L., Blak F.T., Storgaard V. et al // APMIS. - 1995. - № 103. - P. 460-468.

ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ФАГОЦИТАРНИХ КЛІТИН ХВОРИХ ВЕРХНЬОЩЕЛЕПНИМ СИНУСИТОМ, ЩО СТРАЖДАЮТЬ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ

О.В. Огнівенко¹, М.М. Попов¹, О.О. Романова²

¹Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Україна

²Інститут мікробіології і імунології імені І.І. Мечникова АМН України, м. Харків, Україна

РЕЗЮМЕ

У роботі вивчена фагоцитарна активність нейтрофільних гранулоцитів і моноцитів у хворих верхньощелепним синуситом, що страждають на цукровий діабет. У хворих хронічним верхньощелепним синуситом, що страждають на цукровий діабет, спостерігається гноблення фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів і моноцитів, порушення процесів захоплення та кілінга бактерій, депресія оксидазної мікробіцидної системи й активності рецепторного апарата.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: імунітет, фагоцити, хронічний верхньощелепний синусит, цукровий діабет

FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE PHAGOCYTE SELLs AT PATIENTS WITH MAXILLARY SINUSITIS SUFFERING FROM DIABETES

E.V. Ognivenko¹, N.N. Popov¹, E.A. Romanova²

¹V.N. Karazin Kharkov National University, Ukraine

²I.I. Mechnykov Institute of Microbiology and Immunology of the Academy of Medical Science of Ukraine, Kharkiv

SUMMARY

Phagocyte activity of the neutrophilic granulocytes at patients with maxillary sinusitis suffering from diabetes have been investigated. The following phenomena are observed at patients with chronic purulent maxillary sinusitis suffering from insular diabetes: depression of phagocyte of neutrophilic granulocytes and monocytes; disturbance of the process of bacteria capture and killing; depression of oxidase microbicidal system and activity of the receptor system.

KEY WORDS: immunity, phagocytes, chronic maxillary sinusitis, insular diabetes